

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
23 décembre 2004 (23.12.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/111643 A2(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

G01N 33/50

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet  
ARMENGAUD AINE, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2004/001470

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 11 juin 2004 (11.06.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

03 07025 11 juin 2003 (11.06.2003) FR  
04 02993 23 mars 2004 (23.03.2004) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR). ECOLE NORMALE  
SUPERIEURE DE LYON [FR/FR]; 46, allée d'Italie,  
F-69364 Lyon Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JURDIC,  
Pierre [FR/FR]; 5, Impasse du Sablon, F-69003 Lyon (FR).  
DESTAING, Olivier [FR/FR]; 85, Boulevard Yves Farges,  
F-69007 Lyon (FR). SATEL, Frédéric [FR/FR]; 148,  
cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). BONNELYE, Edith,  
Anne-Marie [FR/FR]; 33, rue Léo et Maurice Trouilhet,  
F-69008 Lyon (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 2004/111643 A2

(54) Title: PATTERNS FOR A SKELETAL SYSTEM

(54) Titre : MODELES DE SYSTEME OSSEUX

(57) Abstract: The invention relates to a pattern for a skeletal system comprising a mineralised matrix and osteoblasts. Said pattern is characterised in that the osteoblasts are placed on the matrix in such a way that a confluence carpet and/or nodules are formed and said osteoblasts are placed on said carpet and/or nodules. Said invention also relates to patterns for pathological skeleton systems and to the use of the patterns for screening, aggressiveness and toxicity.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un modèle de système osseux comportant une matrice minéralisée et des ostéoblastes, caractérisé en ce que les ostéoblastes sont déposés sur la matrice de manière à former un tapis à confluence et/ou des nodules, et les ostéoblastes sont déposés sur ledit tapis et/ou lesdits nodules, ainsi qu'à des modèles de système osseux atteints de diverses pathologies. L'invention couvre également les utilisations pour la réalisation de criblages, de tests d'agressivité et de toxicité.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

1

## Modèles de système osseux

La présente invention se rapporte à des modèles de système osseux.

5 Elle vise plus particulièrement des modèles de système osseux *in vitro* comportant une matrice résorbable, des ostéoclastes et des ostéoblastes, une méthode de sélection des matrices utilisables pour les modèles selon l'invention ainsi que des modèles de système osseux mimant une pathologie particulière.

10

L'os est constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire qui est minéralisée. La population cellulaire est composée de deux types cellulaires : les ostéoclastes qui dégradent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui la reconstruisent. Jusqu'à présent, la majorité des travaux de recherche effectuée sur le sujet s'est orientée sur l'étude spécifique des ostéoclastes, en tant que cellules osseuses responsables de la dégradation de la matrice osseuse, sur l'étude spécifique des ostéoblastes ou, sur le choix de matrices artificielles capables de mimer la matrice osseuse humaine. En particulier, l'article par Shibutani et al (*J Biomed Mater Res, Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity*, 31:43-49, 1996) décrit un exemple de matrice minéralisée à base de collagène.

25 Plus récemment, un article par Sun et al (*J Biomed Mater Res, The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities* 45(4) :311-21, 1999) étudie l'influence de la taille des particules de poudre d'hydroxyapatite sur l'activité des ostéoclastes. Une co-culture de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques y est en particulier décrite.

Les travaux des inventeurs les ont amené à mettre au point un modèle de système osseux comportant une matrice minéralisée et des ostéoclastes, caractérisé en ce que des ostéoblastes sont déposés sur la matrice de manière à former un tapis à confluence et/ou des nodules, les ostéoclastes étant déposés sur ledit tapis et/ou lesdits nodules.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

2

La disposition des deux types cellulaires est particulièrement importante pour reconstituer ce système osseux servant de modèle. En effet, les cellules osseuses humaines ne sont activées que dans un certain environnement. Les inventeurs ont réussi à reconstituer cet environnement en réalisant un tapis d'ostéoblastes à confluence ou des nodules d'ostéoblastes, et à poser sur ce tapis ou ces nodules, des ostéoclastes. De manière inattendue, les inventeurs ont constaté que les ostéoclastes, cellules 10 fois plus grandes environ que les ostéoblastes, étaient capables de se frayer un chemin à travers la population jointive d'ostéoblastes (sous forme de tapis à confluence ou de nodules) afin d'aller exercer leur activité de résorption directement sur la matrice osseuse. Les ostéoclastes se trouvent alors localisés sous la population d'ostéoblastes, et ce, au bout de la 2<sup>e</sup> heure environ, qui suit le dépôt des ostéoclastes.

Afin de vérifier que la migration des ostéoclastes à travers la couche ostéoblastique est bien un mécanisme spécifique du tissu osseux, les inventeurs ont repris l'expérience à l'identique sur une lamelle de dentine (support le plus proche de l'os). Or, sur ce support, la migration à travers la couche ostéoblastique a également été observée.

Une telle constatation permet donc de valider le modèle comme adéquat pour mimer le système osseux, et plus particulièrement, le système osseux murin ou humain. D'autres observations, décrites dans les exemples de la présente demande, confirment cette validation.

Avantageusement, le modèle de système osseux selon l'invention comporte une matrice composée de collagène et de phosphate de calcium et/ou des dérivés de phosphate de calcium. De préférence, le dérivé de phosphate de calcium est de l'hydroxyapatite.

De préférence, le rapport entre les ostéoclastes et les ostéoblastes est d'environ 1/10 à 1/25. Ce rapport est variable car dépendant du phénomène que l'on souhaite observer. En effet, si un trop grand nombre d'ostéoclastes est ajouté, il se produira une dégradation

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

3

trop importante et trop rapide de la matrice, gênant ainsi une éventuelle quantification du matériel résorbé (mesure de la surface qui n'est plus minéralisée).

5 Le modèle selon l'invention fournit les moyens de tester l'efficacité de drogues connues ou nouvelles dans la perspective de la mise en évidence de nouveaux traitements thérapeutiques dans un contexte osseux normal ou pathologique.

10 Par « drogues », on entend des molécules biologiquement actives.

Plus particulièrement, l'invention permet de tester le potentiel de toutes drogues déjà connues (ex : biphosphonate, PTH, vitamine D... ou nouvelles sur la formation osseuse (ostéoblastes) et /ou sur l'invasion et /ou sur la migration et /ou sur la résorption osseuse (ostéoclastes) générant ainsi un test rapide in vitro d'évaluation du potentiel thérapeutique de toutes molécules pouvant agir sur le métabolisme osseux, mais aussi des effets néfastes (effets secondaires) de toutes drogues utilisées pour d'autres pathologies ne touchant pas l'os (ex : diabète, maladies cardiaques...).

Dans la demande, le terme « migration » employé seul signifie le mouvement des ostéoclastes durant la résorption. De même, le terme « invasion » employé seul renvoie à la colonisation du support résorber. En revanche, lorsque ces termes sont utilisés pour faire référence à la traversée de la couche ostéoblastique, ils sont suivis d'une expression le précisant.

Selon un mode de réalisation, les ostéoblastes et/ou des ostéoclastes déposés peuvent être génétiquement modifiés. Le dépôt de cellules génétiquement modifiées permet l'étude du comportement de ces cellules et de l'évolution du système osseux, plus particulièrement en vue d'une thérapie génique. L'utilisation de ces cellules génétiquement modifiées est particulièrement adéquate sur les modèles de systèmes osseux présentant une pathologie, tels que décrits par la suite.

WO 2004/111643

PCI/FR2004/001470

4

La présente invention vise également une méthode de sélection de matrices permettant de reconstituer un modèle de système osseux, caractérisée en ce que l'on soumet une matrice minéralisée au procédé suivant :

- 5           - dépôt d'un tapis et/ou des nodules d'ostéoblastes à confluence sur la matrice,
- dépôt d'ostéoclastes isolés sur le tapis et/ou les nodules,
- observation de l'invasion des ostéoclastes à travers le
- 10          tapis et/ou les nodules d'ostéoblastes,
- observation de la résorption de la matrice minéralisée,
- sélection des matrices sur lesquelles les ostéoclastes
- sont localisés entre la matrice et le tapis et/ou les
- nodules d'ostéoblastes et sur lesquelles une résorption
- 15          est observée ;

ainsi que les matrices artificielles sélectionnées à l'aide de ladite méthode.

En effet, le comportement des cellules sur la matrice permet de

20   déterminer si l'environnement choisi pour mimer le système osseux est adéquat. Par l'observation du comportement cellulaire, on peut donc déterminer si la matrice choisie est un bon modèle de matrice osseuse.

25   Avantageusement, le matériau de la matrice à tester pourra être choisi parmi l'ensemble des biomatériaux, c'est-à-dire des matériaux compatibles avec le tissu vivant. Une modification de la matrice (ajout de différents composés protéiques ou autres) peut amener au développement de nouveaux biomatériaux.

30

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'invention propose également des modèles de système osseux mimant des pathologies osseuses. Ces modèles sont réalisés de préférence à partir de cellules (ostéoblastes et/ou ostéoclastes) extraites de tissus provenant de

35   toutes pathologies osseuses.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

5

En particulier, l'invention propose un modèle de système osseux cancéreux, atteint d'ostéoporose, d'ostéomalacie et/ou d'arthrite rhumatoïde.

5 Par « modèle de système osseux cancéreux », on entend les modèles de système osseux correspondant aux pathologies suivantes :

- un malade atteint d'une tumeur primaire cancéreuse,
- un malade atteint d'une tumeur primaire cancéreuse (sein, prostate, ...) avec métastases,
- 10 - un malade atteint d'un cancer des os.

Ces modèles mimant des pathologies utilisent le modèle de système osseux décrit plus haut, mais portant un certain nombre de modifications.

15

Par exemple, pour le modèle de système osseux cancéreux, les modifications sont les suivantes :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, ovariectomisés et/ou orchietomisés
- 20 etc..., et,
- on dépose de plus des cellules issues de lignées cellulaires de cancer.

Pour étudier un cancer des os, les cellules déposées seront par exemple issues d'une lignée cellulaire de cancer des os. Dans le 25 autres cas, on déposera des cellules issues d'une lignée cellulaire de tumeur primaire à potentiel métastatique (sein, prostate, ...) ou non.

30 Ce modèle permet d'observer les phénomènes de colonisation du tissu osseux par les cellules tumorales et de visualiser la phase de métastase. En effet, comme le montre l'invasion des ostéoclastes travers la couche ostéoblastique, les cellules placées dans un environnement mimétique du système osseux, ont la capacité de se 35 déplacer dans cet environnement.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

6

Ce modèle est plus particulièrement adapté pour réaliser un test d'agressivité des cellules tumorales (voir exemple 4). L'existence de nombreux cancers primaires (sein , prostate ....) capables de métastaser dans l'os est maintenant un fait établi en cancérologie. Or, ce cancer de l'os qui en découle s'avère dans la majorité des cas, incurable. L'invention permet de tester in vitro l'agressivité (invasion, migration, prolifération) de cellules tumorales (par exemple, issues de tumeurs mammaires ou de la prostate) provenant de biopsies de patients. Ces cellules tumorales sont déposées sur le modèle de système osseux selon l'invention et permettent ainsi d'estimer le potentiel agressif des cellules de la tumeur primaire au niveau de leur capacité d'invasion, de migration et/ou de prolifération ainsi que d'établir un pronostic sur le développement d'un cancer secondaire osseux.

Plus précisément, l'invention propose un test rapide in vitro d'évaluation du potentiel thérapeutique (chimiothérapie et/ou radiothérapie) de toutes molécules pouvant être utilisées en cancérologie afin de réduire l'apparition et/ou de contribuer au traitement anti-cancéreux d'un cancer de l'os.

Le modèle de système osseux atteint d'ostéoporose comporte les modifications suivantes :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, ovariectomisés et/ou orchietomisés l'ostéoporose étant alors induite chimiquement in situ et/ou d'animaux knock-out, transgéniques pour toutes molécules dont la modulation de l'expression induit une baisse de la masse osseuse,

tandis que le modèle de système osseux atteint d'ostéomalacie est modifié comme suit :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, l'ostéomalacie étant alors induite chimiquement in situ et/ou knock-out pour le récepteur à la vitamine D ou pour toutes autres molécules capables d'induire une ostéomalacie.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

7

De nombreuses molécules sont connues pour induire une ostéoporose. On peut citer, à titre d'exemple, la dexaméthasone, l'hydrocortisone, la prednisolone et ses dérivés, la fluocortolone, l'héparine calcique ou sodique.

De même, l'ostéomalacie peut être induite par les molécules suivantes : les sels d'aluminium, le barbitol et ses dérivés, le rétinol, le bêtacarotène.

10

Enfin, le modèle de système osseux atteint d'arthrite rhumatoïde peut comporter les modifications suivantes :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, l'arthrite rhumatoïde étant alors induite chimiquement *in situ*, et/ou d'animaux knock-out transgéniques pour toutes molécules capables d'induire une arthrite rhumatoïde ou d'animaux ayant subi des injections de collagène de type II, ou de toutes autres substances susceptibles d'induire une inflammation articulaire mimant une arthrite rhumatoïde.

20

Les molécules pouvant induire des arthrites rhumatoïdes sont, à titre d'exemple, certains interférons  $\alpha$ , certains vaccins (BCG, hépatite B, rubéolique...), le cortivazol, certains sels de lithium, l'ampicilline.

25

La présente demande protège également l'utilisation des différents modèles pour réaliser des criblages de molécules thérapeutiques et des tests d'efficacité. A l'aide des modèles selon l'invention, l'efficacité des différentes molécules actuellement connues et de celles qui seront mises à jour pourra être comparée. A titre d'exemple, le test d'efficacité pour l'ostéoporose pourra mettre en comparaison des molécules connues pour rétablir la masse osseuse comme le biphosphonate, les oestrogènes et toutes les nouvelles molécules mises à jour à l'aide du modèle utilisé pour réaliser un criblage. Le test d'efficacité pour l'ostéomalacie pourra prendre comme molécule de référence la vitamine D, tandis que le test pou-

30  
35



WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

8

l'arthrite rhumatoïde pourra prendre comme molécules de référence l'aspirine et/ou les anti-inflammatoires non stéroïdien.

De manière avantageuse, les modèles selon l'invention sont  
5 particulièrement adaptés pour réaliser des tests de toxicité d'un composé chimique dans lesquels au moins une concentration du composé est testée sur un modèle selon l'invention. De tels tests permettent d'évaluer les effets secondaires de médicaments sur la physiologie osseuse (par exemple, les médicaments contre le diabète, les antibiotiques), les effets toxiques des polluants (dioxine, insecticides...), etc... Avantageusement, plusieurs concentrations seront testées afin d'établir une relation entre la concentration du composé et les effets secondaires engendrés dans le modèle de système osseux.

15

Un modèle de système osseux atteint d'ostéomyélite et/ou d'infection osseuse peut également être construit en ajoutant dans le système modèle selon l'invention différentes souches bactériennes et virales. A titre d'exemple, on citera les souches suivantes  
20 *Enterobacter cloacae*, le staphylocoque doré, le streptocoque bêta hémolytique A, *Haemophilus influenzae* type b, les salmonelles *Pseudomonas*, et/ou les pneumocoques.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, avec références aux figures, qui  
25 représentent respectivement :

- la figure 1, un schéma du processus de traversée de la couche ostéoblastique par les ostéoclastes et de résorption ostéoclastique,
- 30 - les figures 2 et 3, des images obtenues par analyse 3D par microscopie confocale montrant l'agencement des deux types cellulaires, A : ostéoclaste, B : ostéoblaste, C : coupe en Z et,
- la figure 4, des images obtenues par analyse 3D par microscopie  
35 confocale montrant l'agencement des deux types cellulaires selon la coupe en Z, afin de déterminer les effets du PP2 (fig. 4B) en comparaison avec l'essai témoin (fig. 4A).

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

9

Exemple 1 : Reconstitution d'une interface osseuse cellularisée pour  
un test de résorption - Tapis d'ostéoblastes à confluence.

a. Matrice

La matrice minéralisée est préparée soit sur lamelles de verre (pour  
microscopie) soit sur plastique traité pour culture cellulaire. Le  
support est d'abord recouvert pendant 15h d'une solution de  
collagène I à 0,1mg/mL diluée dans de l'acide acétique 0,1M. L'excès  
de collagène est éliminé puis le support est recouvert pendant une  
semaine à 37°C avec une solution de TRIS 200mM, pH(8,5), 0,4g/L de  
phosphatase alcaline, 0,4g/L de phosvitine et 3g/L de chlorure de  
diméthyle suborimidate.

Cette étape est suivie de la minéralisation proprement dite. Cette  
minéralisation est constituée de 2 étapes successives :

- 1- le support est recouvert d'une solution TRIS 200mM, pH(8,5)  
0,4g/L de phosphatase alcaline, 0,4g/L de phosvitine pendant  
3h, puis,
- 2- cette solution est remplacée par une solution de TRIS 200mM  
pH(8,5) et de  $\beta$ -glycérophosphate 126,06g/L pendant 20h.

Ces deux étapes sont répétées 10 fois. La trame de collagène I peut  
être complétée avec d'autres protéines (ostéopontine, vitronectine  
BSP, ostéocalcine, collagène de type I conjugué à un agent  
fluorescent, par exemple, la rhodamine, etc...) ou d'autres substituts  
(par exemple, des substituts minéraux : fluor, strontium ranélate...).

b. Ostéoblastes

Des cellules de la lignée ostéoblastique murine MC 3T3 sont mises en  
culture en milieu  $\alpha$ -MEM complété avec 10% en volume de sérum de veau  
fœtal, de la dexaméthasone  $10^{-8}$ M et de l'acide ascorbique 0,028mM.  
Les cellules sont ensuite détachées etensemencées à confluence sur  
le support minéralisé.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

10

Les ostéoblastes peuvent également être issus de lignées ostéoblastiques de rat (Ros) ou humaine (HEPM, hFOB) et préparés selon le même protocole. Alternativement, un protocole de culture primaire d'ostéoblastes est proposé dans l'exemple 2.

5

#### c. Ostéoclastes

Les ostéoclastes issus de cultures primaires humains ou murins ou de lignées (par exemple, la lignée RAW ou lignée humaine GCT23) sont obtenus après 7 jours de différenciation comme décrit dans Destaing et al (Mol Biol Cell, *Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein*, 14(2) :407-16, 2003). Les précurseurs d'ostéoclastes sont cultivés en présence de milieu  $\alpha$ -MEM complété avec 10% en volume de sérum de veau fœtal et de deux cytokines recombinantes : M-CSF et RANK-L (20ng/L). Les cellules sont placées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu est changé tous les deux jours pendant 7-8 jours. Les ostéoclastes différenciés sont détachés avec une solution d'EDTA à 0,25mM diluée dans du PBS 1X. Les ostéoclastes sont ensemencés à une densité de 10 cellules/mm<sup>2</sup>.

20

#### d. Fixation

La fixation est réalisée dans du PBS 1X additionné de formaldéhyde 3,7% pendant 10 min.

#### e. Résultats

La résorption de la matrice minéralisée est observée en microscopie photonique dès la 6<sup>e</sup> ou 7<sup>e</sup> heure suivant le montage du modèle (temps écoulé entre le premier contact ostéoclastes-ostéoblastes et la résorption de la matrice).

30

Une seconde expérience a été menée afin de démontrer que les ostéoclastes sont capables de traverser le tapis dense de cellules ostéoblastiques avant de former des trous de résorption.

35 Par analyse 3D par microscopie confocale, il a été possible de démontrer le pouvoir invasif des ostéoclastes et de quantifier la

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

11

résorption en mesurant la surface du substrat qui n'est plus minéralisée.

La fixation des cellules est réalisée une heure et quatre heures après le dépôt des ostéoclastes.

La figure 2 comporte trois images montrant la localisation des différentes cellules une heure après le dépôt des ostéoclastes.

10 La figure 2A est une image de l'ostéoclaste. Celui-ci présente une forte polarité, ce qui démontre l'état actif des cellules. En effet, un ostéoclaste déposé sur un support non adéquat présente une faible épaisseur (non polarisé). En revanche, sur un support adéquat, celui s'épaissit afin de former un pôle basal (contact avec les

15 ostéoblastes) et un pôle apical (contact avec le milieu). Les inventeurs ont constaté que cette polarité était maintenue durant la traversée de la couche ostéoblastique et maintenue lors de la résorption. Toutefois, le pôle basal se retrouve au contact de la matrice tandis que le pôle apical est au contact des ostéoblastes.

20

La figure 2B est une image de l'ostéoblaste. On constate la présence de nombreux filaments d'actine. Les fibres de stress d'actine constituent un marqueur présent dans les ostéoblastes MC3T3.

25 La figure 2C est une coupe en Z, permettant de visualiser la localisation selon l'axe Z des deux cellules photographiées précédemment. Cette image montre que l'ostéoclaste est situé au dessus du tapis ostéoblastique (ligne claire en continue).

30 La figure 3 comporte également trois images correspondant aux trois images de la figure 2. La figure 3A est une photographie de l'ostéoclaste. Celui-ci a changé de forme, il s'est aplati. La figure 3B représente le tapis d'ostéoblastes. Celui-ci est à présent localisé au-dessus de l'ostéoclaste, ce dernier étant en contact

35 direct avec la matrice (Figure 3C) et présente l'organisation d'un ostéoclaste en cours de résorption (la « sealing zone », structure caractéristique des cellules résorbantes).

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

12

*Exemple 2 : Reconstitution d'une interface osseuse cellularisée pour un test de résorption - Nodules d'ostéoblastes.*

5

a. Matrice

La matrice est préparée comme décrit dans l'exemple 1.

b. Ostéoblastes

- 10 Les ostéoblastes utilisés peuvent être issus de cultures primaires humaines ou murines, ou de lignées comme décrit dans l'exemple 1.

Les cellules ont été isolées par digestion enzymatique (collagénase (Sigma #C-0130)) à partir de calvaria de souris de 2 jours. Les  
15 cellules obtenues des quatre dernières étapes de digestion (population II-V) sont ensuiteensemencées dans des flasques T25 dans du milieu  $\alpha$ MEM contenant 15% de sérum de veau fœtal (Flow Laboratories, McLean, VA) et 100  $\mu$ g/ml pénicilline G (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 50  $\mu$ g/ml gentamycine (Sigma), et 0.3  $\mu$ g/ml  
20 fungizone (Flow Laboratories). Après 24h d'incubation les cellules adhérentes sont rincées au PBS, traitées à la trypsine (0,01%) dans une solution saline de citrate, resuspendues dans le milieu standard décrit précédemment et ensemencées sur des plaques de 12 puits sur la matrice décrite dans l'exemple 1 à  $10^4$  cellules/puit. Après 24  
25 d'incubation, le milieu est changé et supplémenté en acide ascorbique (50  $\mu$ g/ml) et en sodium  $\beta$ -glycérophosphate (10 mM). Le milieu est ensuite changé tous les deux jours. Toutes les plaques sont incubées à 37°C sous une atmosphère à 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>.

- 30 Une culture primaire d'ostéoblastes humains est également possible.

c. Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 1.

35

d. Fixation

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

13

La fixation est réalisée comme dans l'exemple 1.

e. Résultats

La résorption de la matrice minéralisée est observée en microscopie  
5 photonique dès la 7<sup>e</sup> heure suivant le montage du modèle.

Une seconde expérience a été menée afin de démontrer que les  
ostéoclastes sont capables de traverser les nodules d'ostéoblastes  
avant de former les trous de résorption.

10

Par analyse 3D par microscopie confocale, il est possible de  
démontrer le pouvoir invasif des ostéoclastes et de quantifier la  
résorption en mesurant la surface du substrat qui n'est plus  
minéralisée.

15

Comme dans l'exemple précédent, nous avons pu observer la traversée  
des ostéoblastes par les ostéoclastes ainsi que les trous de  
résorption réalisés par les ostéoclastes.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

## Exemple 3 : Variantes des types cellulaires déposés

pathologies osseuses :	description du système
ostéoporose (dégradation de la matrice osseuse due à l'arrêt de la synthèse d'œstrogènes chez la Femme, de la testostérone chez l'Homme.)	-ostéoblastes de souris ovariectomisées (femelle) ou orchietomisées (mâle) + ostéoclastes normaux -ostéoblastes normaux + ostéoclastes de souris ovariectomisées (OVX) ou orchietomisées (ORX) -ostéoblastes+ostéoclastes de souris OVX (femelle) ou ORX (mâle)/ ostéoclastes+ ostéoblastes normaux.
ostéomalacie (déficience en vitamine D engendrant une mauvaise minéralisation de la matrice osseuse)	-ostéoblastes de souris KO VDR (récepteur de la vitamine D) + ostéoclastes normaux -ostéoblastes normaux + ostéoclastes de souris KO VDR (récepteur de la vitamine D) -ostéoblastes+ostéoclastes de souris KO VDR (récepteur de la vitamine D)/ ostéoclastes+ ostéoblastes normaux.
arthrite rhumatoïde (AR) (inflammation causée par une augmentation de la résorption osseuse par les ostéoclastes).	-ostéoblastes de souris (injection collagène type II capable d'induire chez la souris in vivo une AR) ostéoclastes normaux -ostéoblastes normaux + ostéoclastes de souris (injection collagène type II capable d'induire chez la souris in vivo une AR) -ostéoblastes+ostéoclastes de souris AR/ ostéoclastes + ostéoblastes normaux
Autres pathologies osseuses et tous KO déjà connus pour présenter un défaut dans le métabolisme osseux (ALP, src, c-fos, OPG, Rankl, récepteur des œstrogène, aromatase, leptine ....) et qui pourraient être associés à des mutations humaines non encore déterminées: et tous nouveaux knock out.	
test de l'effet de drogues connues - Oestrogènes (SERM, tamoxifène, raloxifène)- testostérone, PTH (Parathyroïde hormone), prostaglandines (PGE2), biphosphonates (alendronate), vitamines D, osteoprotégérine (OPG), RANKL, AINS (Anti-inflammatoires non stéroïdiens, ex :ibuprofène), glucocorticoïdes, hormone thyroïdienne T3.....	
test de l'effet de nouvelles drogues	

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

pathologies cancéreuses	cellules utilisées
cancer du sein : cancer qui métastase en tumeur osseuse 1/3 des ostéoses métastatiques et plus de 2/3 des cancers féminins	-ostéoblastes et ostéoclastes normaux+ lignées cellulaires de cancers mammaires soient agressives (MDA-MB-231) soient non-agressives (MCF-7). Observation de colonisation des cellules mammaires, formation in vitro de tumeurs mammaires.  -ostéoblastes et ostéoclastes anormaux (OVX)+ lignées cellulaires de cancers mammaires. Test du rôle des estrogènes dans le phénomène de cancérisation
cancer de la prostate: cancer qui métastase en tumeur osseuse un des plus fréquents cancers masculins	-ostéoblastes et ostéoclastes normaux+ lignées cellulaires de cancers de la prostate (LAPC-4). Observation de colonisation des cellules de la prostate, formation in vitro de tumeurs  -ostéoblastes et ostéoclastes anormaux (ORX) + lignées cellulaires de cancers de la prostate. Test du rôle de la testostérone dans le phénomène de cancérisation.
autres cancers pouvant métastaser en tumeurs osseuses : -cancer du poumon -cancer du rein -cancer de la thyroïde -cancer digestif -cancer de l'utérus -cancer de l'ovaire	-lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du poumon : A549 -lignées cellulaires humaines de carcinome du rein: ACHN, A704, Caki-1 -lignée cellulaire humaine de carcinome de la thyroïde: FRO -lignée cellulaire humaine de carcinome gastrique: EPG85-257P -lignée cellulaire humaine de carcinome de l'endomètre: HEC-1 -lignée cellulaire humaine d'épithélium de cancer ovarien: EOC

test de l'effet de drogues connues pour agir sur la diminution de l'invasion et de la prolifération cellulaire : agents chimiothérapeutiques, inhibiteur de la cyclo-oxygénase (COX), mélatonine.....  
test de nouvelles drogues



WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

16

*Exemple 4 : Test d'agressivité de cellules tumorales*

5

Une femme sur 4 mourra d'un cancer du sein et un homme sur 3 d'un cancer de la prostate en France (EUCAN, cancer incidence mortality and prevalence un EU 1996).

10

Ces deux cancers sont généralement des cancers primaires qui lorsqu'ils ne sont pas stoppés à temps métastasent dans l'os, cancers qui s'avèrent alors irrémédiablement létaux. Les modèles de système osseux selon l'invention devraient permettre d'étudier pourquoi ces cellules mammaires ou de la prostate métastasent quasi systématiquement dans l'os.

Le système selon l'invention permet en effet de visualiser in vitro l'invasion (ou le chimiotactisme des produits sécrétés par les cellules de cette interface osseuse cellularisée) de cellules cancéreuses mammaires ou de la prostate dans la matrice osseuse. Des lignées de cellules humaines de cancers du sein agressives (MDA-MB 231) ou non-agressives (MCF-7) ou encore des lignées de cellules humaines de cancers de la prostate (LAPC-4) sont déposées sur le système selon l'invention. Cette expérience simple permet d'observer le comportement de ces cellules comparé à d'autres types de cellule connues pour peu métastaser dans l'os, d'observer les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du système osseux ou encore, la formation de masses cellulaires prolifératives, l'éventuelle dégradation de la matrice osseuse.

Une fois la formation de tumeurs in vitro réalisée, une seconde étape consiste à analyser l'efficacité de drogues anti-cancéreuses déjà connues (chimiothérapie...) ou encore à mettre en évidence par criblage de nouvelles molécules actives sur la prolifération cellulaire (diminution de la masse cellulaire ou du nombre de foci).

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

17

*Exemple 5 : Criblage de molécules, à des fins thérapeutiques*

Un inhibiteur de la tyrosine kinase Src, le PP2, a été testé dans le modèle selon l'invention. Ce produit est connu pour ses propriétés anti-resorptives et semble constituer une molécule thérapeutique potentielle pour le traitement de l'ostéoporose. Pour réaliser l'interface osseuse selon l'invention, des ostéoclastes dérivés de RAW-GFP ont été déposés sur un tapis de cellules ostéoblastiques de type MC3T3. Après une durée de 1 heure à 1 heure 30min, en absence de traitement, les ostéoclastes ont traversés ce tapis cellulaire et se sont étalés sous ce dernier. En revanche, si les ostéoclastes sont traités avec l'inhibiteur de tyrosine kinase Src, PP2, à une concentration de 10  $\mu$ M, les ostéoclastes ne traversent plus le tapis de cellules ostéoblastiques (voir fig. 4).

15

Le PP2 est donc capable de bloquer les mécanismes d'invasion des ostéoclastes dans le modèle selon l'invention entraînant ainsi une diminution de la résorption osseuse (incapacité des ostéoclastes d'atteindre la matrice minéralisée).

20

Cette expérience permet de démontrer que l'interface osseuse selon l'invention peut donc être utilisée à des fins de criblage de molécules thérapeutiques.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

18

## Revendications

1. Modèle de système osseux comportant une matrice minéralisée  
5 et des ostéoblastes, caractérisé en ce que les ostéoblastes sont  
déposés sur la matrice de manière à former un tapis à confluer  
et/ou des nodules, et les ostéoclastes sont déposés sur ledit tapis  
et/ou lesdits nodules.
- 10 2. Modèle de système osseux selon la revendication 1,  
caractérisé en ce qu'il mime le système osseux humain.
3. Modèle de système osseux selon la revendication 1 ou 2,  
15 caractérisé en ce que la matrice minéralisée est une matrice  
composée de collagène et de phosphate de calcium et/ou des dérivés  
de phosphate de calcium.
4. Modèle de système osseux selon la revendication 1, 2 ou 3,  
20 caractérisé en ce que la matrice minéralisée est une matrice  
composée de collagène et d'hydroxyapatite.
5. Modèle de système osseux selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le rapport ostéoclaste  
sur ostéoblastes est d'environ 1/10 à 1/25.
- 25 6. Modèle de système osseux selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les ostéoblastes et/o  
des ostéoclastes déposés sont génétiquement modifiés.
- 30 7. Méthode de sélection de matrice permettant de reconstituer un  
modèle de système osseux, caractérisée en ce que l'on soumet une  
matrice au procédé suivant :
- dépôt d'un tapis et/ou des nodules d'ostéoblastes à  
confluence sur la matrice,
  - 35 - dépôt d'ostéoclastes isolés sur le tapis et/ou les  
nodules,

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

19

- 5                   - observation de l'invasion des ostéoclastes à travers le tapis et/ou les nodules d'ostéoblastes,
- sélection des matrices sur lesquelles les ostéoclastes sont localisés entre la matrice et le tapis et/ou les nodules d'ostéoblastes.

8.       Méthode de sélection selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'observation de la résorption de la matrice et que l'on sélectionne les matrices sur lesquelles on observe également une résorption.

10

9.       Matrices artificielles sélectionnées à l'aide de la méthode selon les revendications 7 ou 8.

15      10.     Modèle de système osseux cancéreux, caractérisé en ce que l'on utilise le modèle selon l'une des revendications 1 à 6, modifié comme suit :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, ovariectomisés et/ou orchietomisés,
- 20               - on dépose de plus des cellules issues de lignées cellulaires de cancer.

11.     Modèle de système osseux atteint d'ostéoporose, caractérisé en ce que l'on utilise le modèle selon l'une des revendications 1 à 6, modifié comme suit :

25

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, ovariectomisés et/ou orchietomisés, l'ostéoporose étant alors induite chimiquement *in situ* et/ou d'animaux knock-out, transgéniques pour toutes molécules dont la modulation de l'expression induit une baisse de la masse osseuse.
- 30

12.     Modèle de système osseux atteint d'ostéomalacie, caractérisé en ce que l'on utilise le modèle selon l'une des revendications 1 à 6, modifié comme suit :

- 35               - les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, l'ostéomalacie étant alors induite chimiquement *in situ*

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

20

et/ou knock-out pour le récepteur à la vitamine D ou pour toutes autres molécules capable d'induire une ostéomalacie.

13. Modèle de système osseux atteint d'arthrite rhumatoïde, caractérisé en ce que l'on utilise le modèle selon l'une des revendications 1 à 6, modifié comme suit :

- les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes sont issus d'animaux normaux, l'arthrite rhumatoïde étant alors induite chimiquement *in situ*, et/ou d'animaux knock-out, transgéniques pour toutes molécules capables d'induire une arthrite rhumatoïde ou d'animaux ayant subi des injections de collagène de type II, ou de toutes autres substances susceptibles d'induire une inflammation articulaire minant une arthrite rhumatoïde.

14. Modèle de système osseux atteint d'ostéomyélite caractérisé en ce que l'on utilise le modèle selon l'une des revendications 1 à 6, modifié comme suit :

- on ajoute dans le milieu au moins une souche bactérienne ou virale choisie parmi *Enterobacter cloacae*, le staphylocoque doré, le streptocoque bêta hémolytique A, *Haemophilus influenzae* type B, les salmonelles, *Pseudomonas*, et/ou les pneumocoques.

15. Utilisation des modèles selon les revendications 1 à 6, 10 à 14, pour tester le criblage de molécules thérapeutiques.

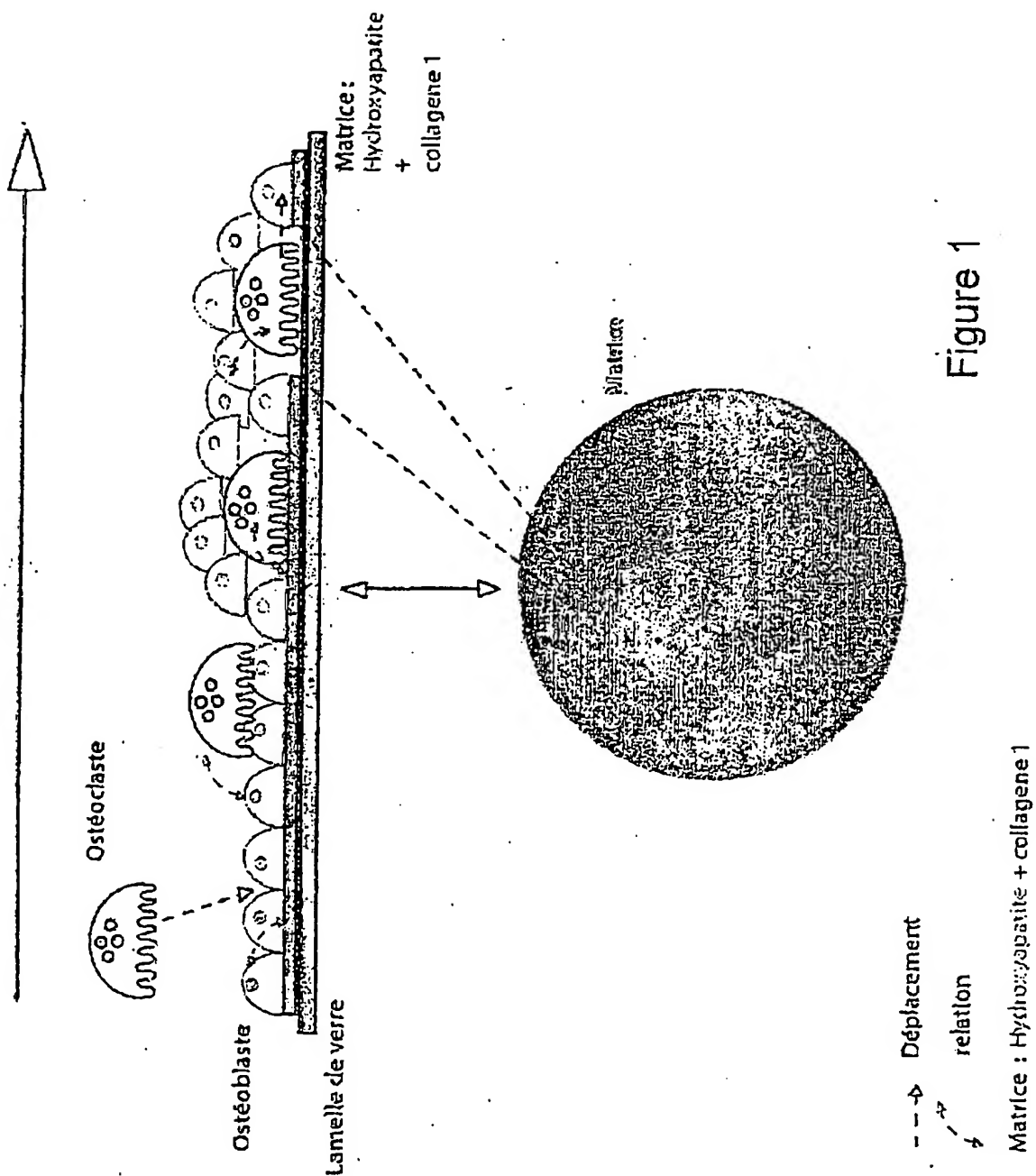
16. Test d'agressivité de cellules tumorales caractérisé en ce que l'on prélève des cellules tumorales sur un patient par biopsie, on dépose les cellules prélevées dans un modèle selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, 11 à 14, selon l'état pathologique du patient, afin d'observer le développement de cancer secondaire osseux.

17. Test de toxicité d'un composé chimique caractérisé en ce que l'on teste au moins une concentration dudit composé sur un modèle selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, 11 à 14.

WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

1/4



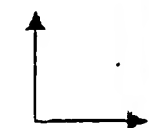
WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

2/4

Ostéoclaste  
Figure 2A

Ostéoblaste  
Figure 2B



Haut

Axe Z

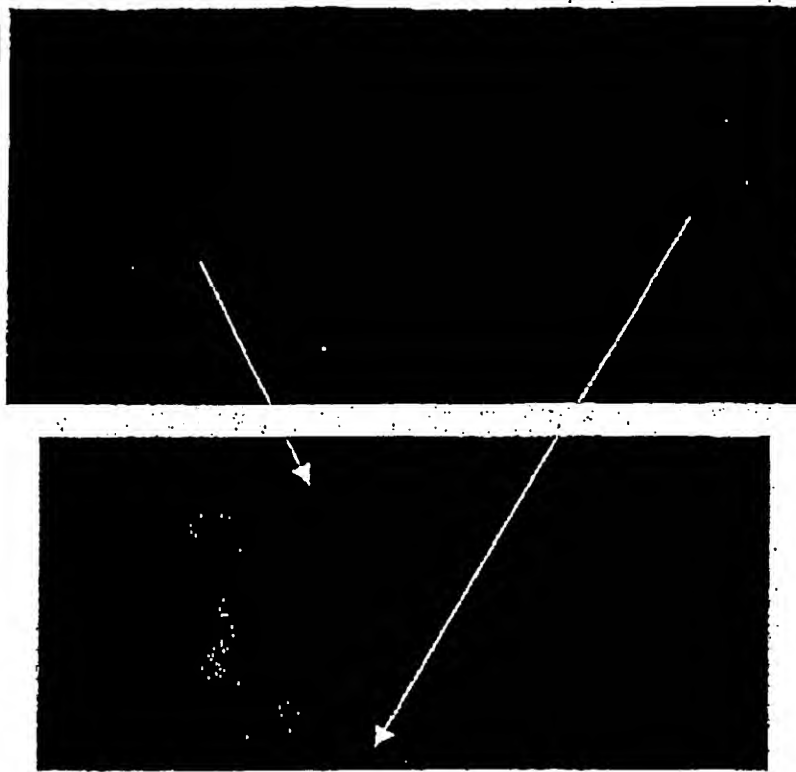


Figure 2C

Figure 2

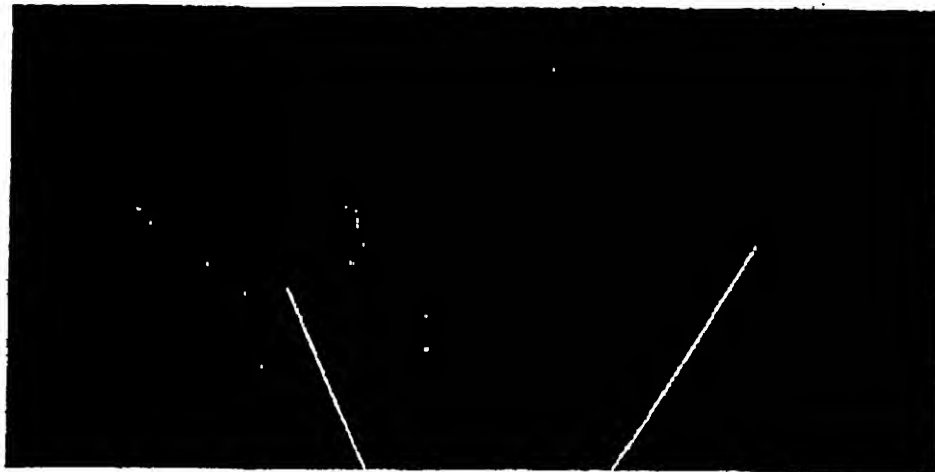
WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

3/4

Ostéoclaste  
Figure 3A

Ostéoblaste  
Figure 3B



Haut



Bas

Figure 3C

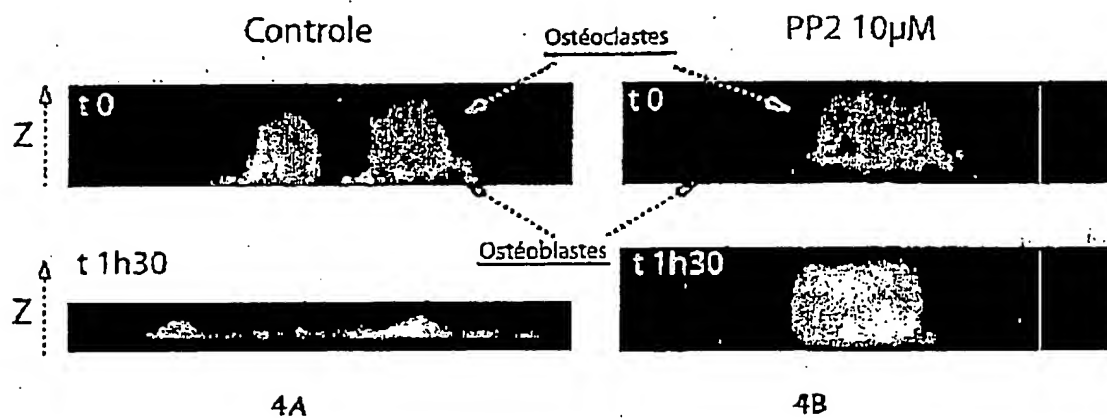
Figure 3



WO 2004/111643

PCT/FR2004/001470

4/4



CP 61010PCT

1/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION )

0	Réservé à l'office récepteur	
0-1	Demande internationale No.	
0-2	Date du dépôt international	
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
0-4	Formulaire - PCT/RO/101 Requête PCT	
0-4-1	Préparé avec	PCT-SAFE [EASY model] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-5	Pétition Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	CP 61010PCT
I	Titre de l'invention	MODELES DE SYSTEME OSSEUX
II	Déposant	
II-1	Cette personne est :	Déposant seulement
II-2	Déposant pour	Tous les Etats désignés sauf US
II-4	Nom:	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
II-5	Adresse:	3, rue Michel Ange 75794 PARIS Cedex 16 France
II-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
II-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR
III-1	Déposant et/ou inventeur	
III-1-1	Cette personne est :	Déposant seulement
III-1-2	Déposant pour	Tous les Etats désignés sauf US
III-1-4	Nom:	ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
III-1-5	Adresse:	46, allée d'Italie 69364 LYON CEDEX 07 France
III-1-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-1-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR

CP 61010PCT

2/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION )

III-2	Déposant et/ou Inventeur	
III-2-1	Cette personne est :	Déposant et inventeur
III-2-2	Déposant pour	US seulement
III-2-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	JURDIC, Pierre
III-2-5	Adresse:	5, Impasse du Sablon 69003 LYON France
III-2-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-2-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR
III-3	Déposant et/ou Inventeur	
III-3-1	Cette personne est :	Déposant et inventeur
III-3-2	Déposant pour	US seulement
III-3-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	DESTAING, Olivier
III-3-5	Adresse:	85, Boulevard Yves Farges 69007 LYON France
III-3-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-3-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR
III-4	Déposant et/ou Inventeur	
III-4-1	Cette personne est :	Déposant et inventeur
III-4-2	Déposant pour	US seulement
III-4-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	SALTEL, Frédéric
III-4-5	Adresse:	148, cours Gambetta 69007 LYON France
III-4-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-4-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR
III-5	Déposant et/ou Inventeur	
III-5-1	Cette personne est :	Déposant et inventeur
III-5-2	Déposant pour	US seulement
III-5-4	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	BONNELYE, Edith Anne-Marie
III-5-5	Adresse:	33, rue Léo et Maurice Trouilhet 69008 LYON France
III-5-6	Nationalité (nom de l'Etat)	FR
III-5-7	Domicile (nom de l'Etat)	FR

CP 61010PCT

3/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION )


IV-1	Mandataire : Représentant commun ou adresse pour la correspondance La personne nommée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme	Mandataire
IV-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	PEAUCELLE, Chantal
IV-1-2	Adresse:	Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS France
IV-1-3	N° de téléphone	01-45-53-05-50-
IV-1-4	N° de télécopieur:	01-45-53-80-21-
IV-1-5	Courrier électronique:	armengau@club-internet.fr
IV-1-6	n° sous lequel le mandataire est inscrit auprès de l'office	92-1189
IV-2	Mandataire(s) supplémentaire(s)	Mandataires supplémentaires ayant la même adresse que le mandataire nommé en premier
IV-2-1	Nom(s)	MICHARDIERE, Bernard (92-1175)
V	DÉSIGNATIONS	
V-1	Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.	
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date de dépôt	11 Juin 2003 (11.06.2003)
VI-1-2	Numéro	03 07 025
VI-1-3	Pays	FR
VI-2	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-2-1	Date de dépôt	23 Mars 2004 (23.03.2004)
VI-2-2	Numéro	04 02 993
VI-2-3	Pays	FR
VI-3	Requête pour le document de priorité L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau International une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures mentionnées ci-dessus sous la/les rubriques:	VI-1, VI-2
VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)

CP 61010PCT

4/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION )

VII-2	Demand d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; référence à cette recherche		
VII-2-1	Date	( . . . )	
VII-2-2	Numéro	FA 640 030	
VII-2-3	Pays (ou office régional)	EP	
VIII	Déclarations	Nombre de déclarations	
VIII-1	Déclaration relative à l'identité de l'inventeur	-	
VIII-2	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	-	
VIII-3	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité de la demande antérieure	-	
VIII-4	Déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	-	
VIII-5	Déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	-	
IX	Bordereau	Nombre de feuilles	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
IX-1	Requête (y compris les feuilles pour déclaration)	5	✓
IX-2	Description	17	-
IX-3	Revendications	3	-
IX-4	Abrégé	1	✓
IX-5	Dessins	4	-
IX-7	TOTAL	30	
	Éléments joints	Document(s) papier joint(s)	Dossier(s) électronique(s) joint(s)
IX-8	Feuille de calcul des taxes	✓	-
IX-17	support matériel PCT-SAFE	-	✓
IX-19	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé	AUCUNE	
IX-20	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
X-1	Signature du déposant, du mandataire ou du représentant commun		
X-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, Prénom)	PEAUCELLE, Chantal	
X-1-2	Nom du signataire		
X-1-3	Qualité		

CP 61010PCT

5/5

REQUETE PCT

Original (pour PRESENTATION)

## RESERVE A L'OFFICE RECEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	
10-2	Dessins:	
10-2-1	reçus	
10-2-2	non reçus	
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale:	
10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	
10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

## RESERVE AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau International	
------	--	--

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**